

PHARMACOLOGICALLY ACTIVE FRACTION OF HYALURONIC ACID,ITS PRODUCTION,AND ITS MEDICINE COMPOSITION

Publication number: JP8259604 (A)

Publication date: 1996-10-08

Inventor(s): VALLE FRANCESCO DELLA [IT]; ROMEO AURELIO [IT]; LORENZI SILVANA [IT] +

Applicant(s): FIDIA SPA +

Classification:






- international: **A61K31/715; A61K47/36; A61K9/08; A61P17/00; A61P27/02; A61P29/00; A61P43/00; C08B33/08; C08B37/08; C12S3/02; A61K; A61K31/715; A61K47/36; A61K9/08; A61P17/00; A61P27/00; A61P29/00; A61P43/00; C07C; C08B33/00; C08B37/00; C12S3/00; (IPC1-7): A61K31/725; A61K47/36; A61K9/08; C08B37/08; C12S3/02**

- European:

Application number: JP19950211646 19950821

Priority number(s): IT19830049143 19831011

Also published as:

 JP2611159 (B2)
 ZA8407942 (A)
 JP6008323 (B)
 IT1212892 (B)
 IL73217 (A)

Abstract not available for **JP 8259604 (A)**

.....
 Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-259604

(43) 公開日 平成8年(1996)10月8日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/08			C 0 8 B 37/08	Z
A 6 1 K 9/08			A 6 1 K 9/08	V
31/725	ABE		31/725	ABE
	ABL			ABL
	ADS			ADS
審査請求 有 発明の数 4 O L (全 16 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-211646	(71) 出願人	591057175
(62) 分割の表示	特願昭59-214046の分割		フィディーア・ソシエタ・ペル・アチオニ
(22) 出願日	昭和59年(1984)10月11日		F I D I A S O C I E T A P E R A
			Z I O N I
(31) 優先権主張番号	4 9 1 4 3 - A / 8 3		イタリア35031アパーノ・テルメ、ピア・
(32) 優先日	1983年10月11日		ポンテ・デッラ・ファブリーカ3/A番
(33) 優先権主張国	イタリア (I T)	(72) 発明者	フランセスコ・デラ・ヴァッレ
			イタリア国バドヴァ、ヴィア・チェラート
			14番
		(72) 発明者	アウレリオ・ロメオ
			イタリア国ローマ、ピアレーイボクラテ93
			番
		(74) 代理人	弁理士 青山 稔 (外1名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸薬理活性画分、その製造方法および医薬組成物

(57) 【要約】

【課題】 医薬品として価値のある、非炎症性のヒアルロン酸フラクションを提供すること。

【解決手段】 分子ろ過にかけて分子量30,000以下のヒアルロン酸フラクションを除去する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒアルロン酸を含有する、入手可能な出発物質からヒアルロン酸の混合物を抽出し、得られた混合物を分子ろ過にかけ平均分子量約30,000～約730,000を有するヒアルロン酸画分を得ることからなり、上記画分は、30,000以下の分子量を有するヒアルロン酸を実質的に含まないものである、実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分を製造する方法。

【請求項2】 ヒアルロン酸の上記混合物を、分子量排除限界約30,000を有する膜を用いて分子ろ過にかけ、30,000以上の大きさの分子量を有する分子を分離し、これによって上記膜上に、30,000以下の分子量を有するヒアルロン酸を実質的に含まない最初のヒアルロン酸画分が留どまるものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 上記最初のヒアルロン酸画分が平均分子量約250,000～約350,000を有するものである、請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記最初のヒアルロン酸画分を、分子量排除限界約200,000を有する膜を用いて、別の分子ろ過にかけ、200,000以上の大きさの分子量を有する分子を分離し、限外ろ過の対象となる混合物の量が初期量の10%に減少するまで限外ろ過を続け、膜を通過する混合物を採取して、その結果平均分子量約50,000～約100,000を有する2番目のヒアルロン酸画分生成物を得るものである、請求項3記載の方法。

【請求項5】 請求項4の分子量排除限界約200,000を有する膜を用いた限外ろ過後、膜上に残留した混合物を採取し、その結果、平均分子量約500,000～約730,000を有する3番目のヒアルロン酸画分生成物を得ることからなる、請求項4記載の方法。

【請求項6】 ヒアルロン酸の上記混合物が、出発組織材料を溶媒抽出させることによって得られる、請求項1～5の何れか1項記載の方法。

【請求項7】 溶媒抽出から得られたヒアルロン酸の混合物をついで酵素分解させる、請求項6記載の方法。

【請求項8】 酵素分解がパパインを用いて行われるものである、請求項7記載の方法。

【請求項9】 平均分子量約30,000～約730,000を有し、30,000以下の分子量を有するヒアルロン酸を実質的に含まない、実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分。

【請求項10】 平均分子量約250,000～約350,000を有する、請求項9記載の実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分。

【請求項11】 平均分子量約50,000～約100,000を有する、請求項9記載の実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分。

【請求項12】 請求項9～12の何れか1項記載のヒアルロン酸画分のナトリウム塩またはカリウム塩。

【請求項13】 平均分子量約30,000～約730,000を有

し、30,000以下の分子量を有するヒアルロン酸またはその塩を実質的に含まない、実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分から成る、組織傷の回復促進剤。

【請求項14】 上記平均分子量が約250,000～約350,000である、請求項13記載の剤。

【請求項15】 上記平均分子量が約50,000～約100,000である、請求項13記載の剤。

【請求項16】 平均分子量約30,000～約730,000を有し、30,000以下の分子量を有するヒアルロン酸を実質的に含まない、実質的に純粋で、非炎症性のヒアルロン酸画分から成る、眼疾患活性を有する薬剤の眼投与用の医薬担体。

【請求項17】 上記薬剤が硝酸ピロカルピン、トリアムシノロン、表皮成長因子、ストレプトマイシンおよびゲンタマイシンから成る群から選択されたものである、請求項16記載の担体。

【請求項18】 上記薬剤が抗生物質、抗緑内障剤、抗アレルギー剤、炎症剤、または目の治療促進剤である、請求項16記載の担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景と分野】本発明は、治療的効用を有し、しかも使用時になんら炎症性を示さないヒアルロン酸（以下HAと省略する）の特定分子量の画分に関する。本発明に示すHA画分の一つは創傷治療を促進するのに有用であり、また他方、第2のHA画分は眼球内液の代用液として眼内使用に有用であり、また骨関節の損傷の治療適用のため関節内注入に有用である。さらにそれらのHA画分は、眼科用薬の賦形薬として角膜上皮とよく適合し得る製剤を調製し、眼科用薬の活性を高めるのに有用であることが明らかにされた。

【0002】

【従来の技術】ヒアルロン酸は、天然に産生され、交互に並ぶD-グルクロン酸残基とN-アセチル-D-グルコサミン残基から構成されている異種多糖類である。HAは、一般に約800万～1300万の高い分子量を有する線状のポリマーで、細胞外皮、脊椎動物の結合組織の細胞外間質物質、関節の滑液、眼の眼球内液、ヒトの臍帯組織、および雄鶏のとさかに存在している。

【0003】HAの利用に関する従来の研究の一つに、眼球内液に代用され、その他の治療にも適用し得る有用なHAの1画分を示したバラズスの研究がある（米国特許第4,141,973号）。然しながら、この特許は平均分子量が約750,000より大きく、好ましくは約1,200,000より大きいHA画分を特に指定している。バラズスは、平均分子量が750,000より小さいHA画分は炎症活性があるので治療用に使用できないことを特に指摘している。これらの低級分子量のHA画分はバラズスによると破棄されている。然しこのために、原料組織から入手される利用可能なHAの総量の約

90%は破棄され、利用可能なHAの僅かな量(約10%)だけが使用される結果となっている。

【0004】バラズスの指摘した結果と逆に、本発明者はHAの低級分子量の画分が、実際に有用な薬学的活性を有することを発見した。したがって、本発明によると種々の材料から入手し得るHAの約80%までが利用される。特に本発明者は、創傷治癒の促進に有用なHAの1画分、および眼の眼球内液の代用液として眼内に注射し、損傷された関節の治療用として関節内注射に使用し得るHAの第2の画分を発見した。

【0005】

【発明の詳細な記載】前述のように、従来のHAの研究では、バラズスの特許に代表される如く、平均分子量が750,000以上の高分子量の画分を使用するように指摘している。本発明者は、低分子量を有する画分と、中間に位置する平均分子量を有するもう一つの画分との2個の新規なHA画分を単離し、確認した。それらの画分は高度の純度を示すので実質的に純粋であると考えられ、しかも炎症活性を有しない。これらの新規HA画分は、ヒアルロン酸の抽出し得る量を含む種々の結合組織から入手することができる。本発明に示した特殊画分は、分子汙過の技術に従って逐次的に分別され、分離される。

【0006】本出願方法によって分離される最初の画分はヒアラスチン(HYALASTIN)と命名され、約50,000~約100,000の平均分子量を有する。このヒアラスチン画分は、その創傷治癒活性から獣医用およびヒト用の治療的応用に好適であることが確認された。本出願方法によって単離された第2の画分はヒアレクチン(HYALECTIN)と命名され、約500,000~約730,000の平均分子量を有する。このヒアレクチンは眼球内液の代用液として眼科手術の際に使用され、また獣医学領域およびヒトにおける関節の外傷性および退行性疾患の治療に好適である。ヒアラスチンは皮内注射、または創傷治癒用の局所剤のいずれでも投与できる。一方、ヒアレクチンは眼内注射および関節内注射が好適である。

【0007】本出願方法においてはHAの各種画分について入念な検討を行い、従来の方法と比べて明らかにより正確な方法を以て、HAの治療上有用な画分と、炎症性で利用できないHA画分とを明瞭に決定づけた。これらの研究の結果から、本発明者はHA画分に特有な二つの性質、即ち細胞可動化(cell mobilization)活性と固有粘度(intrinsic viscosity)を確認し、検討した。動物における創傷治癒の過程は細胞運動性、特に線維芽細胞の細胞運動性によって促進される。一方、細胞運動性または増殖能(即ち、有糸分裂)は、眼球内側の手術の場合はできるだけ回避されるべきである。癒合速度の増大が却って有害な影響をもたらす可能性がある網膜剥離の矯正手術において、このことは特に事実であ

る。

【0008】固有粘度もまた、HA画分の有用性の判定に際して考慮すべき重要な指標である。固有粘度が高い画分は、外傷性および退行性の関節疾患の治療における手術適用に有用であり、また眼球内液の代用液としても有用である。一方、高い粘度は、創傷治癒を促進する薬物として使用される画分にとって好ましくない特性である。事実、創傷治癒に利用される画分は、実際の適用に当たって使用し易いように低い粘度であるべきである。

【0009】本発明においてヒアラスチンと呼ばれる画分は、良好な運動性、即ち細胞増殖能を有し、且つ低粘度を有することが確認された。従って、ヒアラスチンは、創傷治癒の促進に有用な物質として望ましい特性を有する。同時に一方では、この特性がヒアラスチン画分の眼内注射療法、または関節内注射法への適用を好ましくないものにしている。

【0010】本発明において、ヒアレクチンと呼ばれる画分は、細胞運動性、即ち増殖能がごく僅かである一方、同時に高い粘度を有することが確認された。従ってこれらの特性から、ヒアレクチン画分は眼内注射療法および関節内注射療法に有用である。然し他方、ヒアレクチンは細胞運動活性を示さないので、この画分は創傷治癒法には有用ではない。

【0011】ヒアルロン酸の有用な画分を分離する場合、炎症活性を示さない画分を得ることが重要である。前述のバラズスの特許は、炎症活性がないヒアルロン酸画分を得るためには、平均分子量がもっぱら750,000以上の画分だけを使用しなければならないことを教示している。このように、バラズスは炎症活性の理由から有用でないとして、平均分子量750,000以下の画分を破棄している。バラズスの教示に反して、本出願方法はバラズスにより平均分子量750,000以下の画分に帰せられた炎症活性が、実は平均分子量30,000以下の不純物に由来していることを発見した。従って本発明は、化学的方法に引続き、分子量30,000以下の炎症性画分を除去し得る一連の分子汉過技術からなる方法を提供する。

【0012】本発明方法によって、特殊な出発材料から入手し得る総ヒアルロン酸に対し、両者を併わせ約80%の総収率に達する炎症活性のない有用なヒアルロン酸画分を得ることが可能である。この80%の収率で入手し得るヒアルロン酸画分は、ヒアレクチン画分とヒアラスチン画分の双方を含んでいる平均分子量約250,000~約350,000の混合画分からなる。更に限定すれば、ヒアレクチン画分は原料組織から入手し得るHAの約30%の収率で得られ、またヒアラクチン画分は入手し得るHAの約50%の収率で得らる。この要素は、前述のバラズスの特許方法に対し、利用し得るヒアルロン酸の薬学的に有用な量を有意に増大させることを発見した本発明の重要な改良点である。平均分子量75

0,000以上の画分だけを利用するバラズスの特許方法では、動物臓器から利用し得るものとヒアルロン酸の僅かに約10%だけの収率しか得られず、利用し得るヒアルロン酸の約90%は破棄される。このように本発明によって、総ヒアルロン酸抽出物の利用度は著しく高め

られた。

【0013】ヒアルロン酸の各種画分の抽出は相対的収率の比較を表1に示す。

【表1】

表 1

ヒアルロン酸	抽出量 (g/新鮮組織 100g)	収率 (%)	参考文献
総ヒアルロン酸 (雄鶏のとさかを 材料とする)	0.8	100	Swann D.A, 1968, Biochim, Biophys. Acta 156, 17-29
HA (バラズスの方法)	0.08	10	米国特許 第 4,141,973 号
ヒアレクチン+ヒアラスチン	0.6	80	本発明方法
ヒアレクチン	0.2	30	本発明方法
ヒアラスチン	0.4	50	本発明方法
炎症性画分	0.16	20	本発明方法

【0014】添付した図1は、本出願方法で確認された各種のHA画分を図式的に示したものである。図1の釣鐘型の曲線は、原料組織から入手し得るHA画分の分布の概略を表している。図1の「B」領域は、バラズス（米国特許第4,141,973号）によって確認された薬学的に有用なHA画分を表す。A区分は平均分子量30,000以下の炎症性画分であり、I領域はヒアラスチン画分であり、II領域はヒアレクチン画分である。このグラフから、バラズスの方法は平均分子量750,000以下のHA画分を除去することによって利用し得るHA抽出画分の大部分を破棄していることが判る。これに対し、発明では平均分子量が30,000以下の低分子量のヒアルロン酸が炎症活性を生じることを、予かじめ研究者らがHAの種々の抽出物について着目していたので、入手し得るHAの大部分が薬学的に利用できた。

【0015】本発明者は、特別な治療適応により開示した発明技術に従って分離すれば、入手し得る大部分のHAが、実際治療目的に利用できることを発見した。バラズスの特許は入手し得るHAの約10%だけの応用を特定して開示しているが、本発明では創傷治癒の適用に対しヒアラスチン画分の形で、または眼内適用または関節内適用に対しヒアレクチン画分の形で、或いは、創傷治癒の適用に使用できるヒアラスチン画分とヒアレクチン画分を合わせた形で、入手し得るHAの約80%を利用できる。

【0016】確認された画分の化学的および物理的性質を、本発明で調査し、これらの諸性質を表2にまとめた。

【0017】

【表2】

表2 : 化学的および物理的性質

面 分	分子量	動的粘度 (20℃)	乾燥粉末中の ヒアルロン酸の 滴定含量 (%)	タンパク質含 量 (ウニアル ブミン換算)	硫酸ムコ 多糖類 含 量
ヒアラスチン (+ ヒアレクチン	250,000 ~ 350,000	100mP.s (18 w/v %濃度)	>96% ^a	<0.5%	<1%
ヒアラスチン	50,000 ~100,000	600mP.s (5 w/v %濃度)	>96%	<0.5%	<1%
ヒアレクチン	500,000 ~730,000	170mP.s (1 w/v %濃度)	>96%	<0.5%	<1%

^a : 示した数値は、水分除去後のHA滴定値を表わす。例えば、96%という
滴定値は、水分除去後、粉末が不純物4%とヒアルロン酸96%含有する
ことを表わす。

【0018】製造方法

実施例1：炎症活性のないヒアラスチンとヒアレクチン混合物の製造方法

新しい、または冷凍した雌鶏のとさか(3000g)をひき肉器にかけてミンチにひき、次に機械的ホモジナイザーで注意深くホモジネートする。得られたペーストを10容量の無水アセトンと共に、ステンレススチール製容器AISI316またはガラス製容器に入れる。次いで全内容物を、50g/分の速度で6時間攪拌した後、12時間静置して分離し、アセトンをサイフォンで除いて棄てる。この抽出操作を、破棄する。アセトンが正しい湿度水準に達するまで(カール・フィッシャー法)反復する。得られた物質を次に遠心し、好適な温度で5~8時間真空乾燥する。この操作により、雌鶏のとさかから約500~600gの乾燥粉末が得られる。

【0019】次に、この乾燥粉末300gを、適量の塩酸システインの存在下にリン酸バッファー緩衝水性媒質中で、パバイン(0.2g)により酵素的に消化させる。次いで、この混合液を60~65℃の一定温度で24時間、60g/分の速さで攪拌する。この全量にセライト60gを加えて冷却し、なお1時間攪拌を継続する。得られた混合物は、透明な滲液が得られるまで滲過する。次にこの透明な滲液を、分子量の最大端(排出限界)が30,000であるメンブランを用いて限外滲過し、分子量30,000以上の分子をメンブラン上に補足する。原液の5~6倍量を限外滲過し、同時に絶えず生成物に蒸留水を加える。蒸留水を加えて懸濁させ、原容量の1/3となるまで生成物を限外滲過する。残った液体に、0.1モルになるよう塩化ナトリウムを加え、温度を50℃に上昇させる。生成物を60g/分で攪拌しつつ、セチルピリジニウムクロリド45gを加える。この

混合液を60分間攪拌した後、セライト50gを加える。攪拌しつつ生成物の温度を25℃まで下げ、生成する沈澱を遠心して採取する。このようにして得られた沈澱を、セチルピリジニウムクロリド0.05%を含有する塩化ナトリウムの0.01モル溶液(5リットル)に懸濁させる。この懸濁液をさらに50℃で60分間攪拌する。温度を25℃に下げ、沈澱を遠心して採取する。

【0020】次に、洗浄操作を3回反復し、最後に沈澱物を集めて、セチルピリジニウムクロリド0.05%を含有する塩化ナトリウムの0.05モル溶液を加えた容器に入れる。これを60g/分で60分間攪拌し、内容物を25℃の一定温度で2時間放置する。上清を遠心によって除去する。この操作を、0.05%のセチルピリジニウムクロリドを含有する塩化ナトリウムの0.1モル溶液を用いて、数回反復する。混合物を遠心し、上清を棄てる。沈澱を0.05%のセチルピリジニウムクロリドを含有する塩化ナトリウムの0.30モル溶液(3リットル)に分散させる。混合物を攪拌し、沈澱と透明な液の双方を採取する。沈澱はさらに3回、それぞれ前述の溶液0.5リットルを用いて抽出を繰り返す。

【0021】最後に残った沈澱を除去し、透明な抽出液を1個の容器にまとめる。攪拌しつつ溶液の温度を50℃に上昇させる。次に溶液に塩化ナトリウムを0.23モルとなるよう添加する。さらにセチルピリジニウムクロリド1gを加え、12時間攪拌を続ける。混合液を25℃に冷却し、最初はセライト充填物、次いでフィルター(1μ)を通して滲過する。得られた混合液を、次に分子量の最大端(排出限界)30,000のメンブランを用い、塩化ナトリウムの0.33モル溶液を加えて原容量の3倍とし、分子限外滲過を行う。塩化ナトリウム溶液の添加を中止し、液量はもとの容量の1/4まで減

少する。

【0022】このようにして濃縮した溶液は、25℃で攪拌（60g/分）しつつ、エタノール（95%）の3倍量を加えて沈澱させる。沈澱を遠心により採取し、上清は棄てる。沈澱は0.1モルの塩化ナトリウム溶液1リットルに溶解し、95%エタノールの3倍量を用いて沈澱操作を反復する。沈澱を集めて、最初は75%エタノール（3回）、次に無水エタノール（3回）、最後に無水アセトン（3回）で洗浄する。このようにして得られた生成物（ヒアラスチン+ヒアレクチン画分）は、250,000～350,000の平均分子量を有する。ヒアルロン酸の収率は、もとの新しい組織の0.6%に相当する。

【0023】実施例2： 実施例1に記載した方法により得られた混合物からヒアラスチン画分を製造する方法
実施例1に記載した方法により得られた混合物を、発熱物質を含有しない蒸留水に、生成物10mgに対し水1mlの割合いで溶解する。このようにして得られた溶液を、分子量の最大端（排出限界）が200,000のメンブランを用い、メンブラン上に水を加えることなく濃縮手技を用いて、分子限外濾過に掛ける。分子量の最大端が200,000のメンブランを通して限外濾過の操作を行うことにより、分子量が200,000以上の分子は通過しないが、一方、それより小さい分子は水と共に膜を通過しない。濾過操作中は膜の上方部分に水を加えないので、この部分の容量は減少すると共に、分子量が200,000以上の分子の濃度は高まる。2回蒸留した発熱物質を含有しない蒸留水の2倍量を加え、容量が1/3となるまで溶液を再度限外濾過に掛ける。この操作をさらに2回反復する。膜を通過した溶液に塩化ナトリウムを加えて1.0モルとし、次に95%エタノールの4倍量を加えて沈澱させる。沈澱は75%エタノールで3回洗浄し、真空乾燥する。このようにして得られた生成物（ヒアラスチン画分）は50,000～100,000の平均分子量を有する。ヒアルロン酸収率は、もとの新しい組織の0.4%に相当する。

【0024】実施例3： ヒアレクチン画分の製造方法
実施例2に記載した分子量の最大端が200,000の限外濾過メンブランから容器中に集められた濃縮物を、

グルクロン酸を測定する容量分析で、ヒアルロン酸濃度が5mg/mlの溶液となるまで水で希釈する。溶液に塩化ナトリウムを加えて0.1モルに調製し、95%エタノールの4倍量を加えて沈澱させる。沈澱を75%エタノールで3回洗浄し、真空乾燥する。このようにして得られた生成物（ヒアレクチン画分）は500,000～730,000の平均分子量を有する。これは、高純度の約2,500～3,500サッカライド単位の分子鎖長と規定される特定のヒアルロン酸画分に相当する。ヒアルロン酸収率は、もとの新しい組織の0.2%に相当する。

【0025】

【効果】

生物学的および薬学的活性の評価

1. ヒアルロン酸の各画分の生物学的細胞可動化活性
HA画分の細胞可動化活性を評価する方法として、培養における線維芽細胞の解離能を測定することからなる方法を使用した。マウスBALB3T3細胞を、10%ウシ血清、ペニシリン（250単位/ml）およびストレプトマイシン（0.25mg/ml）を添加したダルベッコ修飾のイーグル培地に発育させ、5%CO₂、95%空気中で加湿しながら37℃でインキュベートした。実験のために、細胞は常に60mm直径のプラスチック製組織培養皿に接種（6×10⁵細胞/皿）された。3T3細胞の全面（集密的細胞）単層を傾瀉し、新たにHAの各種分画のそれぞれ2.0mg/mlを含有する媒質を加えた。一定時間後に、細胞解離の状態を顕微鏡的、並びにコールターカウンターで運動している細胞数を数えることの両者により観察した。

解離測定：解離速度を測定するため、細胞をプラスチック皿に接合し、24時間発育させた。この時点で培地を傾瀉して除き、新たに2.0mg/mlのHAを含有する媒質を加えた。それぞれ1枚ずつの試験培養と対照培養からなる2枚の皿を、24時間毎に傾瀉し、上清中にある細胞と付着している細胞とをコールターカウンターでカウントした。表3に、先の実施例1～3で得られた各画分を用いて試験した成績を示した。

【0026】

【表3】

表3：細胞運動試験成績

画 分	濃 度 (mg/ml)	対照と比較し た解離細胞数	有効率(%) (対照と 比較して)
対照		2×10^6	
ヒアレクチン { + ヒアラスチン	2	3.5×10^6	75
ヒアレクチン	2	2.1×10^6	5
ヒアラスチン	2	5×10^6	150

【0027】表3に報告した成績から、ヒアラスチン画分は高い細胞可動化活性を有し、この画分が創傷治癒適用に有用であることが判る。このヒアラスチンの細胞可動化活性から、この画分の薬学的製剤を障害された組織部位に適用すれば、新生細胞の移動と増殖を盛んにすることになると考えられる。これに対して、ヒアレクチン画分は細胞可動化活性が非常に小さく、従って創傷には有用でないと推定される。然し、ヒアレクチンは平均分子量が高く、内部粘度 (inherent viscosity) も高いので、眼内注射および関節内注射用として有用であり、細胞可動化活性が欠除していることは、特に眼内注射および関節内注射にヒアレクチン画分を有用にする、却って重要な特性となっている。

【0028】ヒアルロン酸各画分の走化性

1. -2

材料および方法

ヒト血液PMN（多核形白血球）はドリス R. 等の「ラット好中顆粒球に対するヒアルロン酸およびその可溶性エステル類による走化性作用」（バイオマテリアルズ）(Biomaterials)に投稿）に記載の方法に従い使用する。約750,000ダルトンの分子量を持つヒアルロン酸の熱分解により、ヒアルロン酸の各画分を調製する。得られた試料の分子量を下記の表に示す。

【0029】

【表4】

HAの試料(ダルトン)	
HA	83.000
HA	161.000
HA	182.000
HA	231.000
HA	282.000
HA	291.000
HA	328.000
HA	344.000
HA	357.000
HA	557.000
HA	675.000
HA	697.000
HA	716.000
HA	746.000

【0030】ヒアルロン酸のイン・ビトロでの走化性活性は、先行技術のボイデンチャンバー改良型を用いて求められた。この方法では、標準条件（37℃で1時間インキュベーション）で、フィルター下に通過した溶液とフィルター上に残った細胞の間の勾配の関数により、3μmの穴をもつミリポール[®]・フィルター内の細胞の通過を測定する。

【0031】細胞の走化性活性は「走化性指数」（C.I. = $C/R \times 100$ ）によって測定する。このパラメーターは、走化性物質の存在する場合でのフィルター（μm）内のPMNの細胞移動（C）と走化性物質がない場合の細胞移動（R = 無秩序移動）との比率×100により得られる。

【0032】負の対照は、緩衝液BSS/BSAであり、FMLP（N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine） 10^{-7} M溶液であった。ヒアルロン酸の各画分を3種の異なる濃度、 10^{-4} 、 10^{-2} 、1mg/mlで試験した（ジグモンド、S.Hおよびヒルシュ J.G.、

白血球移動および走化性、ジャーナル・オブ・イクスペリメンタル・メディシン(J. Exp. Med)、(1973年)、173巻、378-410頁)。

【0033】結果

結果は、ヒアルロン酸の走化性が分子量および濃度に依存していることを示している(下記表)。

【0034】

【表5】

ヒトPMNの走化性に対する
HAの分子量および濃度の効果

PM	η 固有粘度	10^{-4} mg/ml	10^{-2} mg/ml	1 mg/ml
HA 83.000	2.80	108	130	179
HA 161.000	4.60	107	134	145
HA 182.000	5.00	100	80	82
HA 231.000	6.00	98	92	113
HA 282.000	7.00	117	105	87
HA 291.000	7.10	109	112	105
HA 328.000	7.80	105	105	105
HA 344.000	8.10	76	101	89
HA 357.000	8.30	79	81	80
HA 557.000	11.60	70	82	59
HA 675.000	13.40	61	61	70
HA 697.000	13.70	61	59	68
HA 716.000	14.00	73	67	109
HA 746.000	14.50	77	59	81

特に低分子量画分は、正の走化性(細胞移動の増大)を示し、一方、高分子量画分は、走化性を低減する。正傾向と負傾向の間の変移点は、分子量約350,000の画分付近にある(図2参照)。

【0035】結論として、ヒアルロン酸が、分子量および濃度に依存し、炎症領域内での炎症性細胞の回復を調節できるということが認められ得る。すなわち、炎症性細胞の回復が、低分子量では増強され、高分子量では低減される。ヒアルロン酸のこの調節活性は、異なる症状でのヒアルロン酸の各画分の臨床的使用を正当化するものである。実際、正の走化性は白血球による菌の貪食過程で要求され、一方、走化性の遮断または低減は抗炎症作用を示し、骨関節症のような炎症性疾患の処置におけるヒアルロン酸の使用が要求され、炎症を抑制する。250,000から350,000ダルトンのヒアルロン酸画分は非常に低い走化性活性をもつと示されているが、画分の濃度を調節することにより、正か、または負かを調節できることは事実である。この方法では、骨関節症または炎症性疾患の制御の両方に対し、種々の濃度で、この画分を用いることが可能である。

【0036】2. ヒアルロン酸の各画分の炎症活性
この評価には、家兎における眼内投与後の侵襲細胞をカウントする方法を使用する。

方法

体重2kgの、視覚に異常のないことを確かめたニュージーランド系またはカリホルニア系家兎5羽を、この試験に使用する。家兎の眼の外側の炎症性の経過は肉眼的

に、また内側は検眼鏡を用いて検査する。眼底が明瞭に見え、正常であれば、試験を実施する。選ばれた動物は、適宜滅菌した眼科用局所麻酔薬を数滴下して局所麻酔を施す。眼科用アトロピン溶液の数滴を同時に滴下する。

【0037】試験は無菌条件下に実施する。眼球を圧迫して突出させ、26ゲージ針を用い縁から約5~6mmの鞏膜を通してガラス体腔の中心に100 μ lの溶液を注射する。もう一つの眼を対照とする。処置後、抗生物質溶液を2滴滴下した後、動物をそれぞれ単独ケージに収容する。50~60時間後、さらに試験を続行する。両眼を、前述の動物を選出した方法と同様にして検査する。ペントバルビタールを静注して、動物を屠殺する。まず最初に、26ゲージ針のインスリンシリンジを用いて、眼房水(約0.2ml)を採取する。次に、眼球を摘出し、すべての異物を除去し、生理食塩液で洗浄し、ビルバララス紙(bilbulous paper)で乾かし、切開して内容物をペトリ皿にあげ、ガラス体の主要部分を分離し、それを滅菌シリンジで採取する(約0.7ml)。ガラス体はポリエチレン製の小試験管に採り、50 μ lのヒアルロニダーゼ(100uNF/ml)を添加する。混合物の粘度を低下させるため、約3時間、37℃の温度に保つ。

【0038】顕微鏡下に位相差法(120 \times)により、白血球数をビュルケル計算板でカウントする。各検体毎に一連の計算値を記録し、平均値を算出し、結果を白血球/mm³として表す。その結果、

- 1) 眼になんらの障害の徴候が認められず、
 2) 処理した5眼のうち、少なくとも4眼で平均白血球数が $200/\text{mm}^3$ を超えず、各対照眼において平均白血球数が $50/\text{mm}^3$ を超えない時、試験は陽性と判断す

る。表6に、前述の実施例1～3で得られたHAの各画分をこの評価に用いて、得られた結果を示す。

【0039】

【表6】

表6：炎症活性試験の成績

画 分	侵襲細胞数
対照	25
ヒアラスチン+ヒアレクチン	32
ヒアラスチン	20
ヒアレクチン	22
炎症性画分(平均分子量30,000)	150
雄鶏とさかから得られた総ヒアルロン酸*	120

* Swann D. A. 1968, B. B. A. 156, 17～29 参照

【0040】表6に示した成績から、ヒアラスチンおよびヒアレクチンの各画分の炎症活性は対照より低く、またヒアラスチンとヒアレクチンの両者を含有する画分が示した炎症活性の増加は対照に比べて無視し得る程度に過ぎないことが明らかにされた。従って、ヒアラスチン画分およびヒアレクチン画分は、好ましからぬ副作用がなく薬学的に有用である。さらにこれらの結果は、HA製剤の炎症活性の原因が、約30,000以下の平均分子量を有するHA画分にあるとする本発明を裏付けるものである。スワンの文献(Swan D. A., 1968, B. B. A. 156, 17～29)に記載された方法に従い、雄鶏のとさかから調製したヒアルロン酸は著しい炎症活性を示す。

【0041】このようにして、平均分子量が約50,000～100,000のヒアラスチン画分は高い細胞可動化活性を有し、従って、不快な炎症反応を示すことなく創傷治療適応に有用であることが明らかになった。平均分子量が約500,000～730,000であるヒアレクチンは、その高い分子量と内部粘度の故に、眼内注射および関節内注射に有用であることが示され、同時にこれらの薬学的適用では回避すべき不快な副作用である細胞可動化活性または炎症反応に亢進しなかった。

【0042】より明確に述べれば、ヒアラスチン画分は次の特性により、創傷治療剤として有用であることが見出された。

1. その製剤によって、通常の治療と比べ、障害部位の急速な清浄化、潰瘍辺縁の正常化、盛んな肉芽組織の形成、マクロファージおよび線維芽細胞の細胞遊走の活性化、および急速な上皮形成を伴う治療時間の急速な短縮を促進される。
2. その製剤によって、重症例における再生手術に対す

る順応の増加が促進される。

3. 瘢痕化組織を最後に仕上げして美容上および機能的に良好な結果を得ることにより、ケロイドまたは退縮製の瘢痕形成を残さないこと。

【0043】ヒアラスチン製剤は、褥瘡傷(床ずれ)、栄養性潰瘍、火傷、無痛性潰瘍、外傷後潰瘍、静脈および静脈炎後の静脈血腫による潰瘍、皮膚病巣、皮膚移植および単純ヘルペスに由来する皮膚病変を含む種々の傷の処置に有用であることが明らかにされた。これらの創傷治療の処置に、ヒアラスチン製剤、またはそのナトリウム塩はガーゼパッド、クリーム、スプレーまたは皮内注射用注射剤のような種々の方法により投与できる。クリームやガーゼパッドに用いる局所適用には、ヒアラスチンは、露出している部分から出る渗出物を吸収し、同時にヒアルロン酸を効果的に拡散させる乳化剤、および傷の包帯の除去を容易にさせるための水に拡散性の賦形薬と組合せることが望ましい。

【0044】ヒアレクチン画分は馬の治療、特に競争馬の関節障害、および急性または慢性の外傷、感染または副腎皮質ステロイドの反復した関節内注射に起因する疾患の治療に有用であることが見出された。特にヒアレクチンで治療し得る障害を例示すると、炎症症状を伴う、または無症状の骨関節症、急性または慢性の滑膜炎、関節軟骨の変性過程、および乾性の関節疾患である。これらの疾患に最も良く見受けられる徴候は一般に、疼痛、関節の機能不全、および関節の屈伸性の減退である。本発明のヒアレクチン画分は、通常の治療に比べ、そのような障害馬に対して関節機能の急速で、しかも持続する改善を早め、また疼痛および跛行を軽減して治療期間を著しく短縮するのに効果があることが判明した。これらの臨床的に好ましい効果は、滑液の粘弾性を回復し、関

節軟骨における組織修復過程を賦活化することにより促進されるものと考えられる。その上、上記の好ましい効果は、すべてヒアレクチン画分が局所のおよび／または全身的に毒性作用を伴うことからさらに増強される。ヒアレクチンを反復して投与しても、アレルギー反応、および何らの有害性または残存性の影響をも生じない。

【0045】薬学的製剤

前記の知見から、ヒアラスチン画分およびヒアレクチン画分は薬学的適用に良好な活性を有することが明らかにされた。次に示す製剤例は、HA画分を実際に生体（インビボ）へ投与する場合に可能な薬学的製剤を、単に例示的に記載する目的で提供するものである。

【0046】A. 創傷治癒用製剤

【表7】

製剤例1：皮内注射用注射剤。1アンプル中：

ヒアラスチンナトリウム塩	2mg
塩化ナトリウム	16mg

注射用精製水 適量を加えて2mlとする。

製剤例2：皮内注射用注射剤。1アンプル中：

ヒアラスチンカリウム塩	5mg
塩化ナトリウム	8mg

注射用精製水 適量を加えて1mlとする。

製剤例3：局所適用用スプレー。1瓶中：

ヒアラスチンナトリウム塩	20mg
塩化ナトリウム	80mg

注射用精製水 適量を加えて10mlとする。

製剤例4：局所適用用スプレー。1瓶中：

ヒアラスチンカリウム塩	30mg
マンニット	100mg

注射用精製水 適量を加えて10mlとする。

製剤例5：局所適用用クリーム。1チューブ中：

ヒアラスチンカリウム塩	25mg
ポリエチレングリコール	
モノステアレート400	1000mg
セチオール（オレイン酸	
デシルエステル）	500mg
ラネッテSX（セチルステアールアル	
コール+ラウリル硫酸塩9：1）	150mg
グリセリン	200mg
ソルビット	150mg
デヒドロ酢酸ナトリウム	10mg
p-オキシメチルベンゾエート	7.5mg
p-オキシプロピルベンゾエート	5mg

再蒸留水 適量を加えて10gとする。

製剤例6：局所適用用クリーム。1チューブ中：

ヒアラスチンナトリウム塩	30mg
パラフィンゼリー	3mg
ポリエチレングリコール	
モノステアレート400	1000mg
セチオール（オレフィン酸	

デシルエステル）	500mg
----------	-------

ラネッテSX（セチルステアールアル	
-------------------	--

コール+ラウリル硫酸塩9：1）	150mg
-----------------	-------

グリセリン	200mg
-------	-------

ソルビット	150mg
-------	-------

デヒドロ酢酸ナトリウム	10mg
-------------	------

p-オキシメチルベンゾエート	7.5mg
----------------	-------

p-オキシプロピルベンゾエート	5mg
-----------------	-----

再蒸留水 適量を加えて10gとする。

製剤例7：医療用ガーゼパット（局所適用）。

1パット中（10×10cm）：

ヒアラスチンナトリウム塩	3mg
グリセリン	1g
ポリエチレングリコール	2g

再蒸留水 適量を加えて3gとする。

製剤例8：医療用ガーゼパット（局所適用）。

1パット中（15×15cm）：

ヒアラスチンカリウム塩	6mg
パラフィンゼリー	0.5mg
グリセリン	1g
ポリエチレングリコール	2g

再蒸留水 適量を加えて3gとする。

製剤例9：創傷治癒用乾燥粉末、乾燥粉末1g中：

ヒアラスチンナトリウム塩	10mg
マンニット	0.75mg
グリシン	0.24mg

B. 眼内適用製剤

製剤例10：1mlバイアル。1バイアル中：

ヒアレクチンナトリウム塩	10mg
塩化ナトリウム	8mg
一塩基リン酸ナトリウム・2H ₂ O	0.25mg
二塩基リン酸ナトリウム・12H ₂ O	3mg

注射用精製水 適量を加えて1mlとする。

製剤例11：5mlバイアル。1バイアル中：

ヒアレクチンカリウム塩	60mg
マンニット	50mg
一塩基リン酸ナトリウム・2H ₂ O	1.25mg
二塩基リン酸ナトリウム・12H ₂ O	15mg

注射用精製水 適量を加えて5mlとする。

製剤例12：シリンジ製剤。1シリンジ中：

ヒアレクチンナトリウム塩	40mg
塩化ナトリウム	16mg
一塩基リン酸ナトリウム・2H ₂ O	0.8mg
二塩基リン酸ナトリウム・12H ₂ O	8.16mg

注射用精製水 適量を加えて2mlとする。

C. 関節内適用製剤

製剤例13：2mlバイアル。1バイアル中：

ヒアレクチンナトリウム	40mg
塩化ナトリウム	16mg

注射用精製水 適量を加えて2mlとする。

製剤例14: 4mlバイアル。1バイアル中:

ヒアレクチンカリウム塩	60mg
マンニット	35mg
グリシン	10mg

注射用精製水 適量を加えて4mlとする。

製剤例15: シリンジ製剤。1シリンジ中:

ヒアレクチンナトリウム塩	25mg
塩化ナトリウム	12mg
マンニット	10mg
一塩基リン酸ナトリウム・2H ₂ O	0.5mg
二塩基リン酸ナトリウム・12H ₂ O	6mg

注射用精製水 適量を加えて2mlとする。

【0047】上記の製剤は指示的目的を以て記載されたものであり、本発明者によって発見されたヒアラスチン画分およびヒアレクチン画分、またはそのカリウム塩またはナトリウム塩を、薬学的に許容し得るその他の基剤、希釈剤、または賦形薬と組合わせることにより、また特定の使用に応じて種々の投与量製剤として、その他の薬学的製剤を調製できることも、当然類推できる。

【0048】創傷治癒に適用するために、ヒアラスチン画分の製剤は、前述したクリーム、スプレー、ガーゼパット、乾燥粉末、または皮内注射のような投与形式のいずれか一つの形で、皮膚の損傷部位に適用される。

【0049】関節内に適用するためには、ヒアレクチン製剤は、前述したバイアル製剤またはシリンジに予製した製剤のいずれかから、一般に関節に対して1投与量2mlの割合で投与される。

【0050】さらにヒアロン酸は、種々の分子の担体として使用でき、効果的であることが研究され、特に角膜表皮に対する耐容性と適合性（即ち、感作現象を起こさない）が完全に保証され、眼科用薬基剤として使用される。ヒアロン酸は眼科用基剤として特に興味深いものと考えられる。前述のように、HAは種々の結合組織および生物学的液体（例えば滑液、および特にガラス体）に存在するグリコサミノグリカンであって、その化学的および物理学的性質、特にその著しい弾粘性により、組織における基本的に重要な構造上の生物学的な役割を果たしている。

【0051】このような理由から、種々の分子量のHA画分、特にヒアラスチン画分とヒアレクチン画分、およびそれらの混合画分を、点眼剤、ゲル、クリーム、挿入剤、または乾燥粉末のような種々の製剤剤型に調製する応用について研究を行った。特に、各種の眼科用薬の基剤として、この生物学的ポリマーの種々の画分を積極的に利用すべく広汎な知識を得るため検討した。

【0052】以下に報告する実験は、ヒアロン酸を賦形薬として含有する製剤が、それらに調合されている主薬の生物学的利用能（バイオアベイラビリティ）を高めるかどうか、また主薬と組合わせることによって相乗効果を生じるかどうかを、特に眼科領域における活性、

若しくは有用性を有する薬物について検討することを目的としている。

【0053】HAの基剤として重要なこれらの活性は、家兎の眼を用い、種類と薬効の異なる4種の眼科用薬、特にピロカルピン、トリアムシノロン、表皮成長促進因子（EGF）およびストレプトマイシンおよびゲンタマイシンのような抗生物質を用いて検討した。これらの薬物はすべて縮瞳作用、抗炎症作用、治癒作用および抗微生物作用を有することが知られている。なかでも、ヒアロン酸を基剤とする抗生物質ストレプトマイシンの活性評価は、この薬剤が眼科領域の感染症に最も広範囲に使用されている抗生物質の一つである理由から非常に重要である。

【0054】研究した実験モデルおよび行った実験を示す。

- 1) ヒアロン酸を基剤とした硝酸ピロカルピンの家兎の眼における縮瞳活性。
- 2) デキストランにより起こした家兎の眼の実験的炎症に対する、ヒアロン酸を基剤としたトリアムシノロンの抗炎症活性。
- 3) 家兎の角膜表皮の実験的損傷に対するヒアロン酸を基剤とした表皮成長促進因子（EGF）の治癒活性。
- 4) ヒアロン酸を基剤としたストレプトマイシンの、寒天培地中におけるバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）6633に対する抗菌活性。

【0055】I. ヒアロン酸を基剤とした硝酸ピロカルピンの縮瞳活性

材料

種々の硝酸ピロカルピン製剤の賦形薬として、次の材料を使用した。ヒアロン酸ナトリウム塩、ヒアラスチン画分（分子量約100,000）、濃度10mg/mlおよび20mg/ml；ヒアロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン画分（分子量約500,000~730,000）、濃度10mg/mlおよび20mg/ml；眼科用賦形薬の対照として、5%ポリビニルアルコール。種々の、硝酸ピロカルピンの2%製剤（点眼薬またはゲル）を、2種類の異なるHAナトリウム塩の10mg/mlおよび20mg/ml濃度を基剤として調製した。

【0056】次の溶液を調製した。

製剤1—硝酸ピロカルピン（PiNO₃）（2%）生理食塩液溶液（対照）。

製剤2—PiNO₃（2%）の5%ポリビニルアルコール溶液（対照）。

製剤3—PiNO₃（2%）のヒアラスチン画分ナトリウム塩（10mg/ml）溶液。

製剤4—PiNO₃（2%）のヒアラスチン画分ナトリウム塩（20mg/ml）溶液。

製剤5—PiNO₃（2%）のヒアレクチン画分ナトリウム塩（10mg/ml）溶液。

製剤6—PiNO₃（2%）のヒアレクチン画分ナトリウム

塩(20mg/ml)溶液。

【0057】方法

白色ニュージーランド系家兎(2~2.5kg)を使用した。試験する製剤をマイクロシリンジ(10リットル)で1眼に滴下し、他の1眼を対照とした。瞳孔の直径を、適宜時間をおき全例について測定した。各溶液はそれぞれ最低8羽の家兎で試験した。各眼の処置は3回を超えることなく、各処置毎の間に最低1週間の休薬期間を置いて観察した。

【0058】測定パラメーター

瞳孔の直径は、時間による縮瞳活性曲線を描くため、種々の間隔を置いて測定した。次の活性パラメーターは、縮瞳/時間グラフに基づいて計算した：

I_{max} = 処置眼と対照眼の瞳孔直径の最大差。

ピーク時間 = I_{max} に達するまでの時間。

持続時間 = 基準条件に回復するまでに要する時間。

プラトー = 絶対縮瞳活性期。

AUC = 縮瞳/時間曲線下の面積。

【0059】結果

試験結果を表8に示す。試験したすべての溶液の、瞳孔

表8： ヒアルロン酸を基剤とする眼科用硝酸ピロカルピン製剤の生物学的活性*

製剤	基 剤	$I_{max}(mm)$ (\pm LF95%)	ピーク時間 (分)	持続時間 (分)	プラト- (分)	AUC(cm^2) (\pm LF95%)	相対的 AUC
1	生理食塩液	1.93 \pm 0.35	20	110	—	117 \pm 28	1
2	5%ポリビニルアルコール	2.33 \pm 0.28	20	140	—	192 \pm 32	1.64
3	ヒアラスチン(10mg/ml)	2.50 \pm 0.42	20	120	—	240 \pm 40	2.05
4	ヒアラスチン(20mg/ml)	2.58 \pm 0.38	30	150	—	208 \pm 41	1.78
5	ヒアレクチン(10mg/ml)	2.50 \pm 0.38	15	170	—	242 \pm 48	2.05
6	ヒアレクチン(20mg/ml)	2.70 \pm 0.38	20	190	45	320 \pm 45	2.73

a：示した値は8羽の値の平均値を表す。

LF：信頼限界

【0061】II. ヒアルロン酸を基剤としたトリアムシノロンの抗炎症活性

材料

次の検体を使用した：ヒアルロン酸ナトリウム塩-ヒアレクチン画分(分子量500,000~730,000)の生理食塩液溶液(10mg/ml)。トリアムシノロンの10%溶液(生理食塩液)。

【0062】方法

ニュージーランド系雄性家兎(平均体重1.6kg)で実験を行った。5日間の予備飼育期間後、デキストラン(10%、0.1ml)を眼内注射し、家兎の眼内炎症を起こさせた。両眼とも4%ノベシーナ(商標、Novesina)で局所麻酔し、前眼房の角膜縁から2mmの位置にシリンジの針を4mmまで挿入し、投与した。試験は10羽で行った。

【0063】処置

各動物とも、右眼および左眼に次の液を1日3回、1回3滴ずつ滴下し、全例6日間処置した。

活性/時間曲線から決定された種々のパラメーターの成績から、2%硝酸ピロカルピン溶液にヒアルロン酸を加えると、薬物の縮瞳活性の増加が上昇することが判る。事実、2%硝酸ピロカルピン水溶液(製剤1)に比べて、薬物のバイオアベイラビリティは2.7倍にまで達する。また、ヒアルロン酸のヒアレクチン画分を基剤として使用した場合、10mg/mlおよび20mg/ml(製剤5、6)の両者とも、ポリビニルアルコールを基剤とした硝酸ピロカルピン溶液(製剤2)と比較して統計的に有意な増加が見られることは注目すべきである。ヒアルロン酸を硝酸ピロカルピンの基剤として使用すると、ピロカルピンの縮瞳活性が一層長く持続することから、ヒアルロン酸を基剤として利用することは特に興味深い。即ち、瞳孔の直径が基準条件に回復するまでに要する時間は、ピロカルピンの生理食塩液単独溶液(製剤1)で110分であるのに比べ、ヒアルロン酸を含有する製剤(製剤6)では190分まで延長される。

【0060】

【表8】

左眼(LE)：10%トリアムシノロン溶液(生理食塩液)。

右眼(RE)：ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン溶液(10mg/ml)+トリアムシノロン(10%)。

【0064】評価方法

デキストランにより生じた炎症反応に対する抗炎症効果を、デキストラン投与前、1、3、24、48時間、3日、4日、5日および6日目にスリット光源を用いて眼を観察して評価した。各観察時、眼の検査は次の所見によって評価した：角膜および結膜に見られる充血、浮腫の有無、特に通常、炎症性薬剤の眼内注射後の炎症経過に敏感な虹彩の所見。濃い、または淡い混濁(片雲)が見られるチンダル効果は、前眼房に微粒子体が存在する(炎症)ことを示している。観察結果は、効果の段階的評価法により主観的に採点(0~1)して表した。

【0065】結果

表9に示した結果から、トリアムシノロンの投与は虹彩に対し抗炎症効果を示し、前眼房の混濁(チンダル効

果)が消失することが判る。炎症の経過は1～3時間目から3～4日間までの間が著しく、その後、徐々に軽快して、6日目までには殆ど常態に回復し、眼は完全に清澄となる。これに対して、ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン画分、をトリアムシノロンと一緒に投与すると、上述のトリアムシノロンの単独投与に比較して眼内炎症の期間が短縮される。即ち、虹彩の炎症経過と前眼房の混濁は24時間までに減少傾向が見られ、48時

間目にはかなり軽快し、4日目以後、炎症反応は完全に消失する。結膜および角膜は、デキストランの眼内注射後も殆ど注意すべき反応は観察されなかった。

【0066】以上のように、トリアムシノロンをヒアルロン酸画分と共に投与すると、家兎の眼の急速な回復が見られ薬物の活性が高められる結果を得た。

【0067】

【表9】

表9：デキストランで生じた眼内炎症に対するヒアルロン酸とトリアムシノロンの併用効果

	評 価 点 数 *															
	デキストラン 投与前		1時間後		3時間後		24時間後		48時間後		3日後		4日後		5日後	
	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE
結膜	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
角膜	0.0	0.0	1.0	0.2	0.0	0.7	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
シノロン	0.0	0.0	1.0	1.2	3.0	3.0	3.0	2.1	3.0	1.2	3.0	0.2	2.2	0.0	1.2	0.0
虹彩	0.0	0.0	0.5	0.7	2.7	2.7	3.0	2.5	3.0	1.2	3.0	0.4	2.4	0.0	1.5	0.0

LE=左眼、トリアムシノロンで処置

RE=右眼、トリアムシノロンとヒアレクチンで処置

a：各値は総計7羽の動物に対する7回の観察の平均値であり、観察効果の段階評価により0～3までの主観的採点法で表してある。

【0068】III. ヒアルロン酸を基剤とするEGFの創傷治癒活性材料

材料

次の材料を使用した。製剤A-EGF（表皮成長促進因子）、生理食塩液に溶解（0.5mg/5ml）。製剤B-ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアラスチン（分子量、約10,000）、生理食塩液に溶解（10mg/ml）。

【0069】方法

雄性白色ニュージーランド系家兎（平均体重1.8kg）

で実験を行った。約5日間の予備飼育後、ノベシーナ（4%）による好適な局所麻酔条件下に、角膜表皮の損傷を実施した。損傷は1眼の光学帯に、鋭い縁を有する凹型ガラスシリンダー（径3mm）で円形に傷をつけた。

【0070】処置

動物は、各群5羽づつからなる群に分け、結膜に次の液を滴下して、薬理的な処置を施した。

【0071】

【表10】

群	処 置
第1群(対照)	生理食塩液
第2群	EGF溶液（製剤A）
第3群	ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン溶液 +EGF溶液-製剤Aと製剤Bを1：1の比率 で組合わせて製剤Cを作る

処置は右眼（RE）に行い、結膜に8時間毎に2滴づつ滴下し、総計3回投与した。

【0072】評価方法

角膜表皮の回復は、損傷後、0.8時間後、16時間後、24時間後、32時間後、40時間後および48時間後に、眼の観察およびスリット光源による写真記録により評価した。

【0073】結果

表11に示したように、眼科的検査の成績から、対照（第1群）は損傷後48時間で完全治癒に到達した（5/5羽）。EGF処置動物（第2群）では、損傷後24時間程度まで治癒経過が早まり明らかにやや有効であった（4/5羽）。ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン画分+EGFからなる製剤Cで処置した動物（第3群）では、治癒経過はすべての動物（5/5羽）で、損傷後16時間程度で完全になった。これらの結果は、角

膜損傷の治療効果をより速やかに促進しており、ヒアルロン酸のヒアラスチン画分がEGFの基剤として使用することが治癒過程を速めることを示している。

【0074】

【表11】

表11：角膜表皮の損傷の治癒

群	処置	損傷の経過時間				
		0	8	16	24	48
第1群	生理食塩液	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
第2群	EGF(製剤A)	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	-	-
第3群	ヒアルロン酸 +EGF(製剤C)	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-

+＝治癒しない眼

-＝治癒した眼

【0075】IV. ヒアルロン酸を基剤とするゲンタマイシンの抗微生物活性

材料

次の材料を使用した。ゲンタマイシンを生理食塩液に溶解(50mg/ml)。ヒアルロン酸ナトリウム塩、ヒアレクチン画分(2mg/ml)。

【0076】方法

11羽の家兎の両眼に、シュードモナス・エルビノーサ(Pseudomonas aeruginosa)の一定量浮遊液(0.1ml)を注入し、敗血症性炎症を起こさせた。敗血症性炎症を示したそれらの家兎の右眼に、ゲンタマイシンとヒアルロン酸、ヒアレクチン画分の組合わせを滴下投与し、左眼にはゲンタマイシンの生理食塩液の緩衝溶液を投与した。処置(6時間毎に3滴)は感染菌注入直後から開始し、感染が消失するまで続けた。家兎の眼は毎日、スリット光源下に観察した。

【0077】結果

ゲンタマイシンのヒアルロン酸との併用による治療は、抗生物質の単独投与に比べ、敗血症感染のより速やかな消失を来した。この結論は、表12に示した結果から明らかである。

【0078】

【表12】

表12：ヒアルロン酸、ヒアレクチン画分を基剤としたゲンタマイシンの敗血症炎症に対する効果

処置	炎症発現からの日数						
	1	2	3	4	5	6	7
ゲンタマイシン+							
生理食塩液緩衝溶液	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	36.3	100
ゲンタマイシン+							
ヒアルロン酸ヒアレクチン画分	0.0	0.0	9.0+	27.2+	72.7+	100	100

数値は百分率で表わした(炎症が治癒した眼の数、処置した眼の数で除す)。

+＝緩衝溶液に対して有意差あり(Fisherのt-

検定で0.05以下)

【0079】本発明に示したHA画分を基剤として使用し得る眼科用薬の例を以下に追加して示す。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

抗生物質：クロラムフェニコール、ネオマイシン、オ

ーレオマイシン、ミキシンおよびポリミキシン、バシトラシン、マイセチン類

ホルモン：ナンドロロンおよび硫酸ナンドロロン

麻酔剤(局所)：ヘノキシネート(henoxinate)および

その塩酸塩

抗ウイルス剤： ヨードデオキシウリジン、ヨードデオキシシチジン

抗炎症剤： デキサメサゾンおよびそのリン酸塩および昇圧剤および血管

収縮剤： シネフリンおよびネオシネフリン

【0080】結論

以上の実験結果から、ヒアルロン酸ナトリウム塩溶液（ヒアラスチンおよびヒアレクチンの両画分）は眼科用薬の基剤として使用でき、異なった生物学的作用を有する種々の型の医薬品に対して効果的であると結論できる。例えば、縮瞳作用、抗炎症作用、治癒作用および抗微生物作用がそれぞれ報告されている。硝酸ピロカルピンのような抗線内症薬、トリアムシノロンのような抗アレルギーおよび抗炎症薬、EGFのような眼の組織治癒を促進させる組織治癒および細胞増殖促進薬、ストレプトマイシンおよびゲンタマイシンのような抗生物質からなる医薬品は、すべてHAを基剤として使用し、効果的に投与できる。

【0081】種々の分子量のヒアルロン酸画分を基剤とする眼科用薬製剤は宿主により完全に忍容され、従って感作現象を高めることなく角膜表皮によく適合することが証明された。

【0082】また、生物学的生成物ヒアルロン酸が、基剤として使用することにより主薬のインビボのバイオアベイラビリティを高め、それらの薬物の薬理学的活性を強めることができる有用な基剤であることは、次に示す実験結果からよく観察できる。

【0083】硝酸ピロカルピンの作用時間を延長し、縮瞳活性を増強し、デキストランにより生じた眼内炎症に対するトリアムシノロンの抗炎症活性を増強し、しかもトリアムシノロン単独と比較して、より短時間に炎症経過を軽減し、角膜の表在性損傷に対する表皮成長促進因子（EGF）の防御活性を、明らかな相乗効果によって増強し、EGF単独投与により回復時間に比べ治癒時間を短縮し、またゲンタマイシンのような抗生物質のインビボの生物学的活性を増強する。この生物学的ポリマー、ヒアルロン酸を、そのような性質と作用の異なる薬物の基剤として使用することにより、他の多くの眼科用薬にその活性を導入することができる。

【0084】下に示すのは、ヒアルロン酸の二つの画分、ヒアラスチンとヒアレクチンだけを賦形薬として使用した粉末、点眼剤、ゲル、クリームまたは挿入剤の剤型をとり得る眼科用薬の製剤例である。

【0085】

【表13】

製剤例1：ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアレクチン画分 10mg
リン酸緩衝液pH7.6Mを含有する生理食塩液 10ml
を含有する“人工涙液”に使用し得る点眼薬。

製剤例2：ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアレクチン画分 20mg
リン酸緩衝液pH7.6Mを含有する生理食塩液 10ml
を含有する“人工涙液”に使用し得る点眼薬。

製剤例3：100g中に；
ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアラスチン画分 55g
ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアレクチン画分 30g
EGF 0.5g
再蒸留水 23.5g
を有するゲル剤。

製剤例4：ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアラスチン画分 100mg
硝酸ピロカルピン 2mg
を含有する硝酸ピロカルピンの100mg挿入剤。

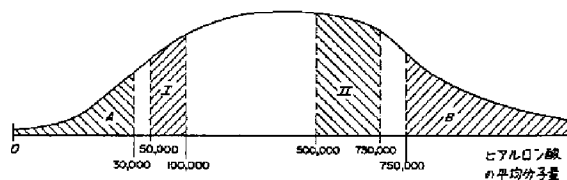
製剤例5：粉末100g中に；
ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアラスチン画分 70g
ヒアルロン酸ナトリウム塩ヒアレクチン画分 28.5g
ストレプトマイシン 1.5g
を含有する局所用ストレプトマイシン含有粉末。

【0086】上記の製剤は代表例を示すべく記載したが、その他の作用薬と、特殊用途に対する種々の投与剤型についても、ヒアルロン酸画分、特にヒアレクチンまたはヒアラスチン画分、またはヒアレクチン／ヒアラスチンの混合画分、またはそれらのカリウム塩またはナトリウム塩を組み合わせることによっても、薬学的製剤を当然調製できる。

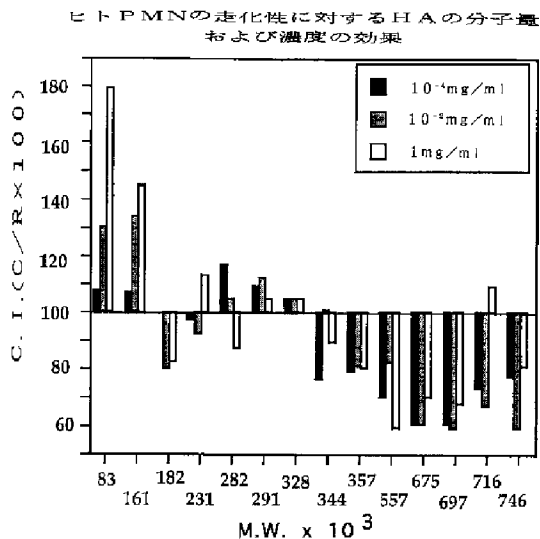
【0087】従って、ヒアルロン酸、特に実質的に純粋なヒアレクチンおよびヒアラスチン画分は、眼科的に有用性または活性を有する種々の薬物と組合わせて使用する効果的な基剤または賦形薬であることが示された。HA画分を医薬品基剤として含有する薬学的組成物は、HA画分が眼に対する高度の耐容性と、角膜表皮に対する高度の適合性を有することから特に有用である。さら

に、HA画分の使用により、眼科用薬のインビボの生物学的活性を実質的に向上する手段が提供される。特に、ヒアレクチンおよびヒアラスチンのHA画分を使用することは、これらの画分を眼に投与しても不都合な炎症性の副作用を示さないことから、一層有用で、しかも重要である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 47/36

A 6 1 K 47/36

N

// C 1 2 S 3/02

8931-4B

C 1 2 S 3/02

(72)発明者 シルヴァナ・ロレンツィ

イタリア国35100パドヴァ、ヴィア・エウ

ガネア108番